NP-49-NP

AD

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. April 2003 (17.04.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/031470 A2

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: C07K 14/44

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/03799

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. Oktober 2002 (02.10.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 48 732.0 2. Oktober 2001 (02.10.2001) DE
101 56 679.4 12. November 2001 (12.11.2001) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **MOLOGEN FORSCHUNGS-, ENTWICKLUNGS- UND VERTRIEBS GMBH** [DE/DE]; 30, Fabeckstrasse, 14195 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **FUERTES, Laura, López** [ES/ES]; 72, 3° dcha, Alonso Cano, 28003 Madrid (ES). **JIMENÉZ, Marcos, Timón** [ES/ES]; 34, 2K Santa Clara, 28200 San Lorenzo de El Escorial (ES).

(74) Anwalt: **BOECKH, Tobias**; HERTIN Anwaltssozietät, 54/55, Kurfürstendamm, 10707 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(regional)*: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** DNA-EXPRESSION CONSTRUCT FOR TREATMENT OF INFECTIONS WITH LEISHMANIASIS

(54) **Bezeichnung:** DNA-EXPRESSIONSKONSTRUKT ZUR BEHANDLUNG VON INFEKTIONEN MIT LEISHMANIOSE

(57) **Abstract:** The invention relates to a DNA-expression construct for treatment of infections with leishmaniasis and a corresponding vaccine. The above serves for immunization against leishmaniasis, whereby the immunogene p36/LACK antigen is used to generate an immunoresponse. A linear double-stranded covalently closed expression cassette is used as gene transport. According to the invention, the gene expression construct can be covalently bonded to an oligopeptide to increase the transfection efficiency.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein DNA-Expressionskonstrukt zur Behandlung von Leishmaniose-Infektionen, sowie eine entsprechende Vakzine. Diese dient zur Immunisierung gegen Leishmaniose, wobei insbesondere das immunogene p36 LACK Antigen zur Erzeugung einer Immunantwort benutzt wird. Als Genfähre wird eine linear-doppelsträngige kovalent geschlossene Expressionskassette verwendet. Das Genexpressionskonstrukt kann zur Steigerung der Transfektionseffiziens mit einem Oligopeptid kovalent verbunden ist.

WO 03/031470 A2

DNA-Expressionskonstrukt zur Behandlung von Infektionen mit Leishmaniose

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein DNA-Expressionskonstrukt zur Behandlung von Leishmaniose-Infektionen, sowie eine entsprechende Vakzine.

Leishmanien sind trypanosomatide Flagellaten aus der Ordnung Kinetoplastida, die durch weibliche blutsaugende Sandmücken der Gattung Phlebotomus und Lutzomyia auf verschiedene Säugetierspezies und auf den Menschen übertragen werden. Leishmaniosen sind Erkrankungen mit verschiedenen klinischen Krankheitsbildern, die ein bedeutendes Gesundheitsproblem darstellen. Die WHO schätzt, dass weltweit ca. 12 Millionen Menschen von der Krankheit betroffen sind. Ca. 2 bis 9% aller HIV-Patienten erkranken an viceraler Leishmaniose, damit ist dies die dritt häufigste parasitäre Krankheit, an der HIV-positive Personen erkranken.

Chemotherapie als Behandlungsmethode zeigt nur einen geringen Effekt.

Da Personen, die die Infektion überstanden haben, eine starke Immunität gegen eine spätere Infektion entwickeln, sollte die Entwicklung eines wirksamen Impfschutzes möglich sein.

Das Prinzip der Immunisierung beruht auf der Wiedererkennung von Strukturen bereits erfolgreich bekämpfter Erreger. Zwei Hauptarme der Immunabwehr können dabei unterschieden werden: der humorale, welcher auf der Synthese von Antikörpern beruht, die in der Lage sind, im extrazellulären Raum befindliche Bakterien zu bekämpfen und der zelluläre, der im Wesentlichen auf der Aktivität von T-Lymphozyten des Immunsystems beruht. T-Lymphozyten sind in der Lage, mit Viren infizierte Zellen zu erkennen. Die humorale Immunabwehr wird auch als Th2 pathway und die zelluläre Immunabwehr als Th1 pathway bezeichnet. Die Impfung bzw. Immuntherapie von Leishmaniose, deren Ursache intrazelluläre Parasiten sind, sollte durch die Erzeugung einer Th1-typischen Immunreaktion möglich sein. Im

Stand der Technik wird vielfach auf die Bedeutung der Erzeugung einer Th1 Antwort in der Therapie oder Prävention von Leishmaniose hingewiesen. (Handman et al., J Immunol 160: 3949-57, Gurunathan et al., Nature Med: 4(12): 1409-15). Zur Förderung der Auslösung einer Th1-typischen Immunantwort wird auf das kostimulatorische Zytokin IL-12 als unerlässliches Adjuvanz verwiesen (Parker et al., J. Immunol. 140: 896-902).

Verschiedene Antigene wurden in experimentellen Impfprotokollen in Mäusen getestet. BALB/c Mäuse sind ein gutes Modell zum Studium der Leishmaniose. Es bestehen im Infektionsverlauf und der Läsionsentwicklung sehr große Ähnlichkeiten zum Menschen. Die immunologische Reaktion in Mäusen auf diese Infektion, scheint der im Menschen und wahrscheinlich auch der in Hunden zu gleichen (Cox, Int. J. Parasitol. 263: 1147-1157). Verwendete Antigene waren das gp 63 (Scott et al., J. Exp Med.168: 1675-1684), gp 46 (McMahon-Pratt et al., Infection and Immunity 61: 3351-3359), p-4 und p-8 (Scott et al., Immunology 99: 615-624) sowie das p36 oder auch als LACK bezeichnete Antigen (Gonzales-Aseguinolaza et al., Eur. J. Biochem. 259: 909-916). LACK ist ein 36 kDa Antigen von Leishmanien, das hochkonserviert ist und in allen verwandten Leishmaniaarten zu finden ist. Exprimiert wird es sowohl in der parasitären Promastigote und Amastigote, den beiden Stadien des parasitären Zyklus im Wirt. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß die Induktion einer zytotoxischen Th1, auf Interferon-gamma und IL-12 Sekretion durch T-Helferzellen, Immunantwort die Überwindung einer Testinfektion fördert, während die Induktion einer IL-4 getriebenen Th2 Helferzellantwort die Infektion begünstigt. Um die Verschiebung der Immunantwort in Richtung Th1 zu fördern, setzten Gonzalo et al. Vaccinia Virus als virale Genfähre und IL-12 als Adjuvanz ein. Als Immunogen wurde p36/LACK Antigen benutzt. Verschiedene Impfregime wurden zusammengestellt. Das erfolgreichste Impfregime, Erstimmunisation mit p36 Protein, Zweitimmunisation mit rekombiantem Vaccinia Virus, kodierend für p36 und IL-12, führte zu einer durchschnittlichen Verkleinerung der Läsionen um 52% im Vergleich zu ungeimpften Mäusen. Den größten Infektionsschutz wiesen die Tiere auf, die den höchsten IgG2a Antikörpertiter hatten (Gonzalo et al., Microbes and Infection: 3 (9): 701-711).

Zum Einschleusen der die immunogenen Antigene oder Teile davon kodierenden DNA sind verschiedene chemische, physikalische und biologische Transfektionsmethoden bekannt.

Biologische Mittel zur Transfektion, sog. Genfähren, sind virale Vektoren, Plasmide oder kovalent geschlossene minimalistische DNA-Konstrukte, die im folgenden MIDGE genannt werden (MINIMALISTIC IMMUNOLOGICALLY DEFINED GENE EXPRESSION VECTORS, vgl. EP 0 914 318 B1).

Plasmide werden durch bakterielle Fermentation gewonnen. Sie enthalten neben dem gewünschten Gen auch die für ihre Vervielfältigung und Selektion notwendige DNA, üblicherweise Resistenzgene gegen bei der Fermentation verwendete Antibiotika. Diese bakterielle DNA hat den Nachteil, dass sie immunstimulatorische Sequenzen ("ISS", z.B. nicht-methylierte Cytosin-Guanin Dinukleotide, „CpG") enthalten kann. Bei Immunsuppression ist genau diese Wirkung nicht erwünscht (ausführlich beschrieben in DE 199 35 756). Bei der Verwendung von Genexpressionskonstrukten auf Basis von Plasmid-DNA besteht zudem das inhärente Risiko der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen, welches insbesondere bei Schutzimpfungskampagnen nicht vertretbar ist. Aus diesem Grund ist auch die von Gurunathan et al. (J. Exp. Med., Vol 186, No. 7, (1997): 1137-1147) vorgeschlagene Methode der Vakzinierung mit eukaryotischen Expressionsvektoren, die das Leishmania-spezifische p36 LACK-Antigen enthalten, äußerst nachteilig. In der medizinischen Praxis stehen die beschriebenen Nachteile plasmidbasierter Expressionsvektoren ihrer breiten Anwendung massiv entgegen.

Die auf Grund ihrer hohen Transfektionseffizienz am häufigsten eingesetzten Genfähren sind virale Vektoren. Jedoch stehen die mit deren Einsatz verbundenen Sicherheitsrisiken einer breiten Anwendung in erheblichem Maße entgegen. Es ist bekannt, dass ein hohes Risiko einer zytotoxischen Reaktion des Wirtsorganismus auf die transfizierten Zellen besteht. So führte die Anwendung einer hohen Dosis eines Adenovirus bei einem klinischen Versuch zum Tod des Patienten; offensichtlich war die Ursache dafür eine starke Überreaktion des Immunsystems (Lehrman, 1999, Nature 401: 517-518). Weiterhin ist durch Instabilität des attenuierten Impfstammes die Rückverwandlung in einen virulenten Stamm nicht auszuschließen.

Außerdem können die viralen Bestandteile selbst immunogen wirken, was zu einer Herabsetzung ihrer Wirksamkeit durch das Immunsystems des Patienten führt.

Neben diesen Nachteilen, die durch die bisherigen Gentransfermethoden bedingt sind, ist es bisher trotz aller Bemühungen noch nicht gelungen, einen effektiven und sicheren Impfschutz gegen Leishmaniose zu entwickeln.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Mittel zur Verfügung zu stellen, welches ein sicheres, effektives und schützendes Impfen gegen Leishmaniose ermöglicht.

Die Aufgabe wird durch die Merkmale der unabhängigen Ansprüche gelöst.

Die Erfindung basiert auf der Zurverfügungstellung eines DNA-Expressionskonstrukts zur Immunisierung von Leishmaniose-Infektionen, wobei die immunisierenden Polynukleotidsequenzen als Expressionskonstrukte vorliegen, die aus kovalent geschlossenen linearen Desoxyribonukleinsäuremolekülen bestehen, welche einen linearen Doppelstrangbereich aufweisen, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge durch kurze einzelsträngige Schlaufen aus Desoxyribonukleinsäurenukleotiden verknüpft sind, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge nur aus der kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines im zu impfenden Tier operablen Promotors und einer Terminatorsequenz besteht und zur Verstärkung der Transfektionseffizienz mit einem oder mehreren Peptiden gekoppelt ist (vgl. EP 0 941 318 B1). Ein derartiges DNA-Expressionskonstrukt zeigt überaus überraschende Wirkungen (siehe unten), die mit anderen Methoden (zitierte Impfprotokolle) nicht zu erreichen sind; insbesondere treten auch die oben beschriebenen Nachteile von eukaryotischen Expressionsvektoren bei der Vakzinierung nicht auf.

Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass das immunogene p36 LACK Antigen zur Erzeugung einer Immunantwort verwendet wird. Als Genfähre wird eine linear-doppelsträngige kovalent geschlossene Expressionskassette verwendet. Diese besteht aus der kodierenden Sequenz, dem Promotor und gegebenenfalls Terminationssequenzen, so dass das Konstrukt nur die für die Expression des gewünschten Gens notwendige Information enthält (vgl. EP 0 941 318 B1) Ferner ist erfindungsgemäß vorgesehen, dass das DNA-Expressionskonstrukt zur Steigerung

der Transfektionseffizienz mit einem Oligopeptid kovalent verbunden ist, welches vorzugsweise eine Länge von fünf bis 25 Aminosäuren hat und mindestens die Hälfte der Aminosäuren zu der Gruppe Lysin oder Arginin gehören. Besonders bevorzugt ist eine Kernlokalisationssequenz, insbesondere

- Die ein Kern-Lokalisierungssignal (Nuclear Localization Signal = NLS) darstellende Peptidsequenz PKKKRKV (Prolin-Lysin-Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Valin = Seq ID 3) aus dem Simian Virus SV-40. Speziell für das SV-40-NLS wurde gezeigt, dass Proteine bis zu 465 kDa zum Zellkern gesteuert werden (Lanford et al. 1986, Cell 15; 46 (4): 575-82). Diese Fähigkeit des Peptids wurde hier durch Kopplung an DNA für die Verbesserung des Gentransfers genutzt.

- oder das elf Aminosäuren lange T-Peptidfragment (YGRKKRRQRRR = Seq ID 2) des HIV-1 Genprodukts TAT.

Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen enthalten. Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen und Figuren näher beschrieben und diskutiert.

Die überraschende Wirkung des erfindungsgemäßen DNA-Expressionskonstrukts und eines Arzneimittels, welches ein solches enthält, wird anhand der Darstellungen gem. der Figuren deutlich. Dabei bedeuten:

pMOK p36	Plasmid kodierend für p36 Antigen
Mp36-NLS	MIDGE kodierend für p36 Antigen mit NLS Peptid gekoppelt
pMOK ctr	Kontrollplasmid kodierend für HBsAg
rVVp36	rekombinanter Vaccinia Virus kodierend für p36
Phosphat	Phosphatpuffer als Kontrolle
Kontrolle +	Positivkontrolle, mit L. major infizierte Seren von Mäusen
Kontrolle -	Negativkontrolle, Seren unbehandelter Mäuse

Es zeigt:

Fig. 1: die Bestimmung des Gesamt IgG Titer vor Belastungsinfektion mit Leishmania major Promastigoten. Nur die Impfregime, die eine Zweitimmunisierung mit rekombinantem Vaccinia Virus beinhalten, zeigen einen messbaren Antikörpertiter.

Fig. 2: Bestimmung des Gesamt IgG Titer nach Belastungsinfektion. Alle Impfprotokolle zeigen eine meßbare Antikörperantwort, wobei der höchste Titer an zirkulierenden Antikörpern von MIDGE p36-NLS / MIDGE p36-NLS ausgelöst wird.

Fig. 3: das Verhältnis der Antikörper-Isotypen IgG 2a und IgG 1 nach Zweitimmunisierung und Belastungsinfektion mit L. major Promastigoten. Überraschenderweise lösen die mit dem NLS-Peptid gekoppelten MIDGE eine nach der Antikörper-Isotypenverteilung zytotoxische Immunantwort (Th1) aus, die sich von der durch das Regime pMOKp36/rVVp36 ausgelösten nur gering unterscheidet.

Fig.4: die Entwicklung der Läsionen in einem Zeitraum von 8 Wochen nach der Belastungsinfektion. Dabei bewirken die Impfprotokolle basierend auf MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS und pMOK p36/ rVV p36 den längsten Schutz gegen eine Infektion mit Leishmania major. Die Schutzwirkung wird durch eine deutlich verzögerte Läsionsentwicklung sichtbar. Der wirksamste und langanhaltenste Schutz wird jedoch durch MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS erreicht.

Fig. 5: die Größe der Läsionen nach Woche 8. In der achten Woche nach der Belastungsinfektion ist die Läsionsgröße bei den mit MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS geimpften Tieren um 80% kleiner als bei der ungeimpften Kontrollgruppe. Es konnte sogar eine 11 prozentige Steigerung des Schutzes vor L. major im Vergleich mit der mit pMOK p36/rVV p36 geimpften Gruppe festgestellt werden.

Im einzelnen:

Es wurde untersucht, ob die Modifikation der minimalistischen Expressionskassetten mit Peptiden eine Änderung der Stärke oder Ausrichtung der Immunantwort zu erreichen vermag. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurde versucht, verschiedene Peptide und andere organische Moleküle an die MIDGE kovalent zu koppeln.

So ist es gelungen durch kovalente Kopplung des Kernlokalisationssignals (NLS) aus dem SV 40 Virus an für HBsAg kodierende MIDGE, einen 10- bis 15-fach erhöhten Antikörpertiter nach intramuskulärer Applikation nachzuweisen (Schirmbeck et al., J. Mol Med. 2001 Jun.79 (5-6): 343-50).

In einem Impfversuch in Mäusen wurden verschiedene Genexpressionskonstrukte, die für das Antigen p36 LACK kodierten, getestet. So wurden mit NLS Peptid gekoppelte MIDGE (MIDGE p36-NLS), Plasmid (pMOKp36) und rekombinanter Vaccinia Virus (rVVp36) eingesetzt. Um einen möglichst hohen Immunschutz zu erreichen, wurden verschiedene Impfregime formuliert. Als relevante Parameter für den klinischen Erfolg der Impfung wurde das Wachstum der infektionsbedingten Läsionen in der infizierten Hinterpfote des Tieres gemessen. Als Surrogat-Parameter wurde das Verhältnis zwischen den IgG1 und IgG2a Antikörpersubtypen bestimmt. Allgemein läßt sich feststellen, daß ein zum IgG2a verschobenes Verhältnis der Subtypen mit Schutz vor Infektion bzw. eines deutlich verlangsamstem Wachstum der Läsionen korreliert. Neben der aus dem Stand der Technik bekannten Methode der Erstimmunisierung mit Plasmid und der Zweitimmunisierung mit rekombinantem Vaccinia Virus (rVV), sollte getestet werden, ob ein ähnlicher Immunschutz auch mit dem erfindungsgemäßen Arzneimittel erreicht werden kann.

Die Antikörpertiter für Gesamt IgG als Maß für die Auslösung einer Immunantwort wurden mittels ELISA bestimmt. Dabei konnten vor der Belastungsinfektion mit Leishmania major Promastigoten nur durch zwei Impfregime messbare Antikörper erzeugt werden (s. Fig. 1). In beiden Fällen wurde rekombinanter Vaccinia Virus als Zweitimmunisation (Boost) verwendet. Verschiedene Studien beweisen, dass zirkulierende Antikörper allein noch nichts über eine vermeintliche Schutzwirkung aussagen. Ein Zusammenhang zwischen zirkulierenden Antikörpern und Schutz vor Infektion kann erst nach der Belastungsinfektion gesehen werden. In Fig. 2 sind die Antikörpertiter nach der Belastungsinfektion mit L. major dargestellt. Alle Impfregime

zeigen messbare Antikörpertiter, wobei der höchste mit MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS erreicht werden konnte.

Die Antikörperisotypen IgG1 und IgG2a wurden bestimmt, um einen möglichen Th2/Th1 shift in der Immunantwort nachzuweisen. Die Isotopenverteilung von Immunglobin gamma (IgG) für ein bestimmtes Antigen spiegelt die Ausprägung der gesamten Immunantwort gegen dieses Antigen wider. Dabei sind IgG –1 Subtypen charakteristisch für eine humorale Antwort, begleitet von einer verstärkten Ausschüttung von Interleukinen IL-4 und IL-10 durch aktivierte Lymphozyten, ein erhöhter Spiegel von Subtyp IgG 2a ist typisch für eine zelluläre Th1-Antwort, begleitet von erhöhter Ausschüttung von IFNγ und IL-12. Das Auftreten der Isotypen ist dabei nicht exklusiv, die relativen Titer können jedoch als Indikator für die dominante Art der entstandenen Immunantwort gewertet werden.

Gemäß Fig. 3 sind mit dem NLS Peptid gekoppelte MIDGE Vektoren in der Lage, eine zelluläre (Th1) Immunantwort auszulösen. Wie dargestellt, ist der zelluläre Arm der Immunantwort entscheidend in der Bekämpfung intrazellulärer Parasiten. Die von MIDGE p36-NLS ausgelöste Verschiebung der Th2 in Richtung Th1 Antwort, unterscheidet sich nur gering von der durch pMOKp36/rVVp36 ausgelösten.

Zur Beurteilung der erreichten Schutzwirkung wurde eine Belastungsinfektion mit Leishmania major Promastigoten durchgeführt. Anhand des Größenwachstums der Läsionen in Abhängigkeit von der Zeit in Wochen wurde der Impferfolg bewertet. Dabei zeigte sich, dass die mit MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS behandelten Mäuse die vom Durchmesser kleinsten Läsionen aufwiesen, also MIDGE p36-NLS im Impfregime MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS den längsten Impfschutz bewirkt (s. Fig. 4 u. 5).

Diese Ergebnisse sind insofern sehr überraschend, da das erfindungsgemäße Arzneimittel in seiner Wirkung das derzeit im Stand der Technik als „bestes" bezeichnete Impfregime der Zweitimmunisierung (Boost) mit rekombinanten Vaccinia Virus übertrifft, und die möglichen Nebenwirkungen, die von Plasmiden und attenuierten Viren ausgehen, vermeidet (Gonzalo et al., Microbes and Infection:3 (9) :701-711). Gleichzeitig ist das erfindungsgemäße Arzneimittel vergleichbar bis besser in seiner Schutzwirkung. Die Vermeidung von potentiellen Nebenwirkungen durch Plasmide

und rekombinanten Viren ist der entscheidende Vorteil des erfindungsgemäßen Arzneimittels, die Herstellung ist einfacher und kostensparender, zudem ist das erfindungsgemäße Mittel wesentlich sicherer.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1.1: Klonierung des Plasmids pMOKp36

Vom Ausgangsplasmid pSCp36 wurden 2 Fragmente mittels PCR amplifiziert:

1. PCR ca. 800 bp;

Primer: links 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT (= Seq ID 6),

Primer: rechts 5'-TTATATGAGCTCAGAAGACACGGACAGGGACCTCTTCCGTCG (= Seq ID 7)

2. PCR ca. 950 bp;

Primer: links 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT (= Seq ID 8),

Primer: rechts 5'-TTATATGAGCTCTTACTCGGCCGTCGGAGATGG (= Seq ID 9)

Das PCR-Produkt aus der 2. PCR wurde mit Eco31I geschnitten und das kleinere Fragment (ca. 200 bp) isoliert.

Das PCR-Produkt aus der 1. PCR wurde mit BpiI geschnitten.

Das 200 bp Fragment und das geschnittene Fragment aus der 1. PCR wurden ligiert und anschließend mit KpnI und SacI geschnitten und in den mit KpnI und SacI geschnittenen pMOK-Vektor ligiert. Das entstandene Plasmid erhielt den Namen pMOKp36 (= Seq ID 1).

Beispiel 1.2: Kopplung der NLS Sequenz an Oligonukleotide

Die NLS Kopplung wurden wie folgt vorgenommen: das NLS Peptid mit der Sequenz PKKKRKV wurde in zwei Schritten an die ODN's gekoppelt. Zuerst wurde das modifizierte Oligonukleotid 5'-PH-dGGG AGT CCA GT xT TTC TGG AC (wobei

xT für aminomodifizierte Thyminbase mit C_2 – Amminolinker steht, = ODN 1 = Seq ID 4) (0,1mM) mit sulfo-KMUS (5mM) in PBS bei Raumtemperatur (RT) aktiviert. Nach 120 min. wurde die Reaktion mit 50 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethane gestoppt und das aktivierte ODN nach Ethanolpräzipation (300mM NaOAc pH 5.2, 5.5 mM $MgCl_2$, 70 % Ethanol), Zentrifugation und einmaligem Waschen mit 70% Ethanol erhalten. Das so erhaltene ODN (0,1mM) wurde in PBS gelöst und reagierte mit dem Peptid (0,2mM) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Gelektrophorese (3%) und Ethidiumbromidfärbung überprüft. Das entstandene NLS gekoppelte ODN wurde durch HPLC aufgereinigt und zur Synthese der MIDGE p36-NLS Konstrukte verwendet.

Beispiel 1.3: Herstellung der MIDGE p36-NLS

MIDGE sind lineare, kovalent geschlossene Expressionskassetten, die lediglich aus dem CMV Promotor, einem Intron, der entsprechenden Gensequenz und einer Polyadenylierungssequenz bestehen (vgl. EP 0 941 318 B1). Die Konstrukte wurden wie folgt erhalten: das unter Beispiel 1.1 beschriebene Plasmid pMOKp36 wurde mit Eco 31I vollständig verdaut. Die Ligation mit 5' phosphorylierten haarnadelförmigen Oligodesoxynukleotiden (ODN) 5'-PH-GGG AGT CCA GT XT TTC TGG AC (= ODN 1 = Seq ID 4) und 5'-AGG GGT CCA GTT TTC TGG AC-3' (= ODN 2 = Seq ID 5) durch T4 DNA Ligase in Anwesenheit von Eco 31I wurde durch Erhitzen auf 70°C gestoppt. Das resultierende Gemisch wurde konzentriert und mit Eco 31I und T7 DNA Ligase in Abwesenheit von Deoxyribonukleotid-Triphosphaten behandelt. Die Aufreinigung erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie.

Beispiel 1.4: p36 Antikörperbestimmung in Mäusen

MIDGE p36-NLS, pMOKp36 und rekombinanter Vaccinia Virus p36 (rVV) wurden in weibliche (Balb/c) Mäuse nach folgendem Impfregime injiziert.

Tabelle 1

Gruppen	Erstimmunisierung (prime)	Zweitimmunisierung (boost)
1	pMOKp36	pMOKp36
2	MIDGE p36-NLS	MIDGE p36-NLS

3	pMOK Kontrolle	pMOK Kontrolle
4	pMOKp36	rVVp36
5	MIDGE p36-NLS	rVVp36
7	Phosphatpuffer	Phosphatpuffer

Je Gruppe wurden 10 Mäuse eingesetzt.

Die verwendeten DNA Mengen betrugen für:
pMOKp36: 100µg, i.d.
MIDGE p36-NLS: 54,8µg, i.d.
rVV p36: 5x107 pfu/Maus, i.p.
und wurden in Natriumphosphatpuffer pH 7,2 gelöst, injiziert.

Nach 2 Wochen erfolgte die Zweitimmunisierung (boost) mit den entsprechenden (s. Tab. 1) DNA Konstrukten. Drei Wochen nach dem Boost erfolgte die Belastungsinfektion mit $5x10^4$ Leishmania major Promastigoten. Diese wurden den Mäusen in die rechte Hinterpfote s.c. injiziert. Der Stand der Infektion wurde wöchentlich verfolgt. Die Größe der Läsionen wurde mit einer elektronischen Schiebelehre durch Vergleich mit der linken unbehandelten Hinterpfote bestimmt.

Acht Wochen nach der Belastungsinfektion wurden von allen Mäusen die Seren gewonnen. Der Gesamt-IgG Antikörpertiter gegen das p36 Antigen und die Bestimmung der IgG 2a und IgG 1 Antikörper erfolgte mittels ELISA, wobei die Absorption in OD (Optische Dichte) bei einer Wellenlänge von λ = 406 nm bestimmt wurde.

Patentansprüche

1. DNA-Expressionskonstrukt zur Immunisierung gegen Leishmaniose-Infektionen, dadurch gekennzeichnet, dass die immunisierenden Polynukleotidsequenzen als Expressionskonstrukte vorliegen, die aus kovalent geschlossenen linearen Desoxyribonukleinsäuremolekülen bestehen, welche einen linearen Doppelstrangbereich aufweisen, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge durch kurze einzelsträngige Schlaufen aus Desoxyribonukleinsäurenukleotiden verknüpft sind, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge nur aus der kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines im zu impfenden Tier operablen Promotors und einer Terminatorsequenz besteht, wobei das DNA-Expressionskonstrukt zur Steigerung der Transfektionseffizienz mit einem oder mehreren Oligopeptiden kovalent verknüpft ist.

2. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1, wobei das Expressionskonstrukt ein oder mehrere Leishmania Antigene kodiert.

3. DNA-Expressionskonstrukt nach den Ansprüchen 1 und 2, wobei das Expressionskonstrukt das p36 LACK Antigen kodiert.

4. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1, wobei das Oligopeptid aus 3 bis 30 Aminosäuren besteht, von denen mindestens die Hälfte basische Aminosäuren aus der Gruppe Arginin und Lysin kommen.

5. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 4, wobei das Oligopeptid die Aminosäuresequenz PKKKRKV (Polin-Lysin-Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Valin) aufweist.

6. Verwendung des DNA-Expressionskonstrukte gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung eines Impfstoffes zur Behandlung von Leishmaniose-Infektionskrankheiten.

7. Vakzine zur Behandlung von Leishmaniose-Infektionskrankheiten, enthaltend das DNA-Expressionskonstrukt nach den Ansprüchen 1 bis 6.

Fig. 1 Bestimmung des Gesamt IgG Antikörpertiter gegen das p36 LACK Antigen vor der Belastungsinfektion mit L. major

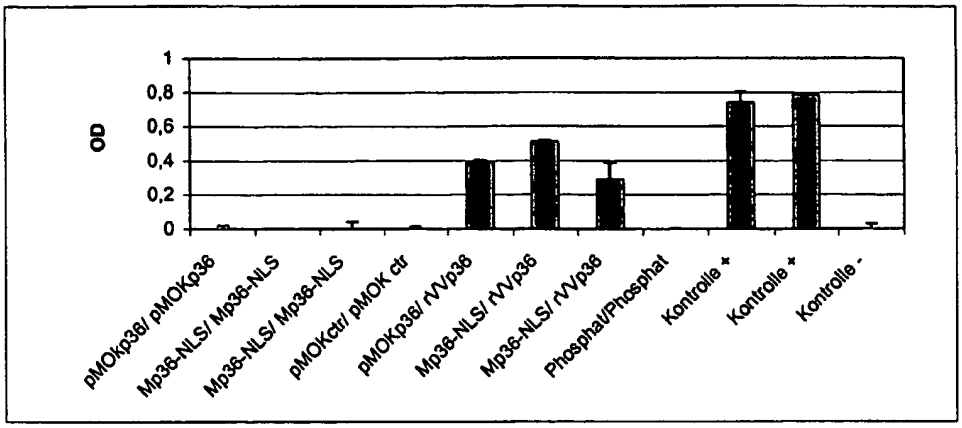


Fig. 2 Bestimmung des Gesamt IgG Antikörpertiter gegen das p36 LACK Antigen nach der Belastungsinfektion mit L. major

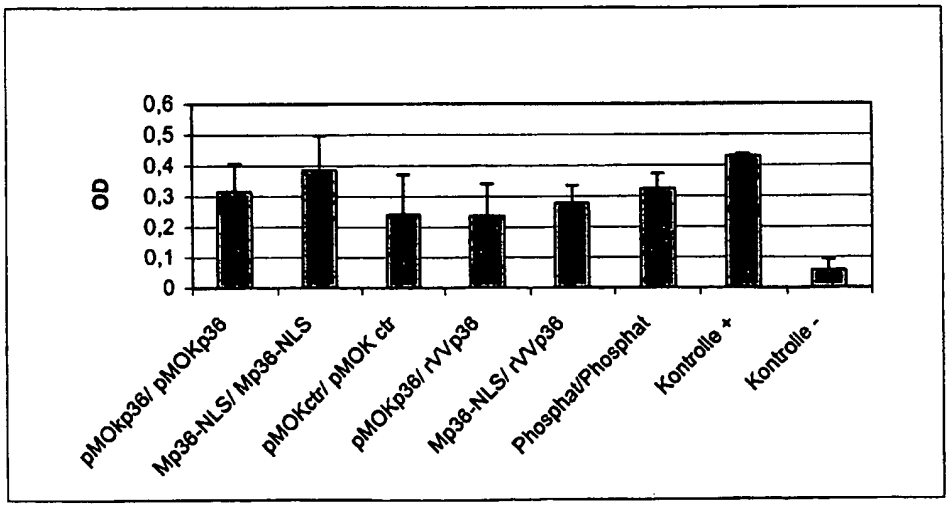


Fig. 3 Verhältnis der Isotypen IgG 2a/IgG 1 gegen p36 LACK Antigen

Impfregime	Isotypenverhältnis
pMOkp36/pMOKp36	0.9
Midge p36-NLS/Midge p36-NLS	1.3
pMOKctr/pMOKctr	1
pMOKp36/rVVp36	1.66
Midge p36-NLS/rVVp36	1.35
Phosphatpuffer/Phosphatpuffer	0.96

Fig. 4 Kinetik der Läsionsentwicklung

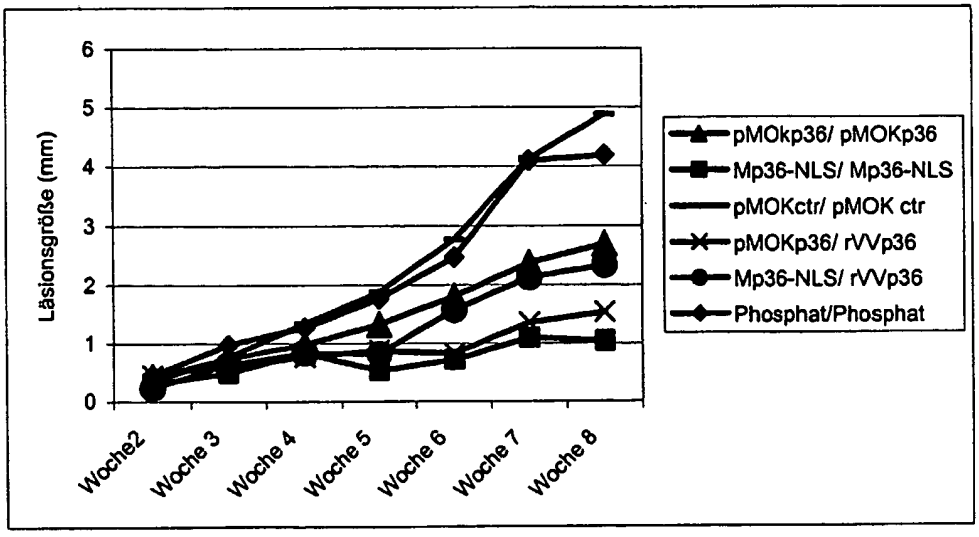
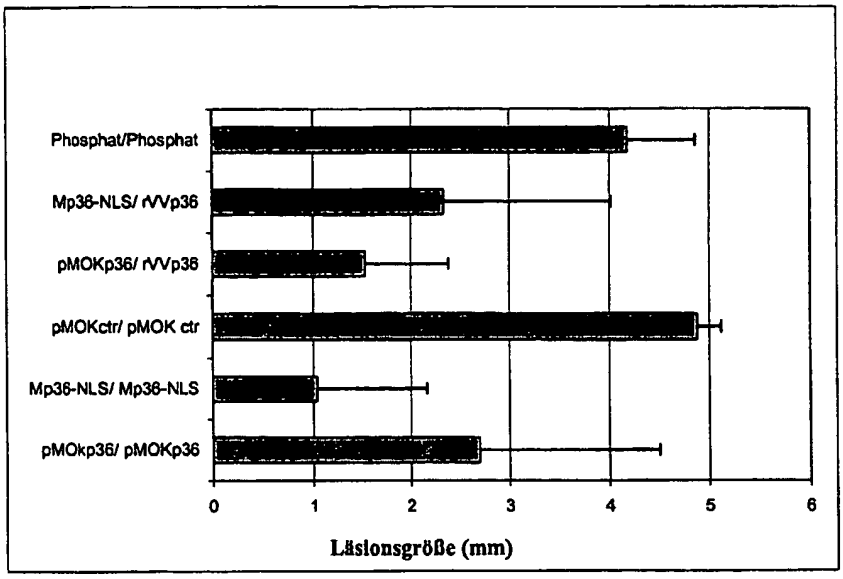


Fig. 5 Größe der Läsionen nach der Belastungsinfektion in Woche 8



Mologen-Leishmania-PCT.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Mologen Forschuungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH

<120> DNA-Expressionskonstrukt zur Behandlung von Infektionen mit Leishmania major

<130> XI 1396/02

<150> DE 101 48 732.0
<151> 2001-10-02

<150> DE 101 56 679.4
<151> 2001-11-12

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 4791
<212> DNA
<213> Plasmid pSCp36

<220>
<221> misc_feature
<222> (1939)..(1045)
<223> Kanamycin resistance, reverse complementary

<220>
<221> promoter
<222> (2447)..(3243)
<223> CMV

<220>

<221> Intron

<222> (3250)..(3386)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (3393)..(4331)

<223> p36 protein

<220>

<221> polyA_site

<222> (4338)..(4539)

<223> poly A site aus SV 40

<400> 1

tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta 60

tcagctcact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag 120

aacatgtctc gggaggcctc acgtgacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac 180

cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccccctga cgagcatcac 240

aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg 300

tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac 360

ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat 420

ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag 480

cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac 540

ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt 600

gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt 660

atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 720

aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga 780

aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac 840

gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc 900

cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggtct 960

gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca 1020

tccatagttg cctgactccc cgtctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat 1080

gcgctgcgaa tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc 1140

gccaagctct tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac 1200
acccagccgg ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca tgatattcgg 1260
caagcaggca tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc tcgccttgag 1320
cctggcgaac agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc 1380
gacaagaccg gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc 1440
gaatgggcag gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga 1500
tactttctcg gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa 1560
tagcagccag tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc 1620
cgtcgtggcc agccacgata gccgcgctgc ctcgtcttgc agttcattca gggcaccgga 1680
caggtcggtc ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc 1740
atcagagcag ccgattgtct gttgtgccca gtcatagccg aatagcctct ccacccaagc 1800
ggccggagaa cctgcgtgca atccatcttg ttcaatcata atattattga agcatttatc 1860
agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag 1920
gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc attattatca 1980
tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgtctcgcg cgtttcggtg 2040
atgacggtga aaacctctga cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag 2100
cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc gggtgttggc gggtgtcggg 2160
gctggcttaa ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag agtgcaccat atgcggtgtg 2220
aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgccattcg ccattcaggc 2280
tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga 2340
aaggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac 2400
gttgtaaaac gacggccagt gccaagcttg gtctcctccc ggatcctcaa tattggccat 2460
tagccatatt attcattggt tatatagcat aaatcaatat tggctattgg ccattgcata 2520
cgttgtatct atatcataat atgtacattt atattggctc atgtccaata tgaccgccat 2580
gttggcattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 2640
gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 2700
ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 2760
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 2820
atcaagtgta tcatatgcca agtccgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg 2880
cctggcatta tgcccagtac atgaccttac gggactttcc tacttggcag tacatctacg 2940
tattagtcat cgctattacc atggtgatgc ggttttggca gtacaccaat gggcgtggat 3000
agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 3060
tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa taaccccgcc ccgttgacgc 3120
aaatgggcgg taggcgtgta cggtgggagg tctatataag cagaggtcgt ttagtgaacc 3180

gtcagatcac tagaagcttt attgcggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca 3240

gtgctcgagc aggtaagtat caaggttaca agacaggttt aaggaggcca atagaaactg 3300

ggcttgtcga gacagagaag actcttgcgt ttctgatagg cacctattgg tcttactgac 3360

atccactttg cctttctctc cacaggggta ccatgaacta cgagggtcac ctgaagggcc 3420

accgcggatg ggtcacctcc ctggcctgcc cgcagcaggc ggggtcgtac atcaaggtgg 3480

tgtcgacgtc gcgcgatggc acggccatct cgtggaaagc caaccccgac cgccacagcg 3540

tggacagcga ctacggtctg ccgagccacc gcctcgaggg ccacaccggc ttcgtgtcgt 3600

gtgtgtcgct ggcccacgcc accgactacg cgctgaccgc gtcctgggac cgctccatcc 3660

gcatgtggga cctgcgcaat ggccagtgcc agcgcaagtt cctgaagcac accaaggacg 3720

tgctcgccgt cgccttctcg ccggacgacc gcctgatcgt gtccgcgggc cgcgacaacg 3780

tgatccgcgt gtggaacgtg gcgggcgagt gcatgcacga gttcctgcgc gacggccacg 3840

aggactgggt gagcagcatc tgtttctcgc cgtcgctgga gcatccgatc gtggtgtccg 3900

gcagctggga caacaccatc aaggtatgga acgtgaacgg gggcaagtgt gagcgcacgc 3960

tcaagggcca cagcaactac gtgtccacgg tgacggtgtc gccagacggg tcgctgtgcg 4020

cgtccggcgg caaggacggc gcggcgctgc tgtgggacct gagcaccggc gagcagctgt 4080

tcaagatcaa cgtggagtcg cccatcaacc agatcgcctt ctcgcccaac cgcttctgga 4140

tgtgcgtcgc gacggagagg tccctgtccg tgtacgacct ggagagcaag gctgtgattg 4200

cggagctgac gccggacggc gcgaagccgt ccgagtgcat ctccattgcc tggtccgccg 4260

acggcaacac tctgtactcc ggtcacaagg acaacctgat ccgcgtgtgg tccatctccg 4320

acgccgagta agagctcgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat 4380

gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata agctgcaata 4440

aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg 4500

aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca aatgtggtag aattcagggg gagacccaat 4560

tcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac 4620

aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg cctaatgagt gagctaactc 4680

acattaattg cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg 4740

cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg c 4791

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1, TAT peptide

<400> 2

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Simian virus 40, NLS peptide

<400> 3

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> ODN 1

<220>

<221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> xT = Thymin modified with a reactive amino group

<400> 4
gggagtccag ttttctggac 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> ODN 2

<400> 5
aggggtccag ttttctggac 20

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> 1. PCR: Primer left

<400> 6

ttatatggta ccatgaacat acgagggtca cct 33

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> 1. PCR: Primer right

<400> 7
ttatatgagc tcagaagaca cggacaggga cctcttccgt cg 42

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> 2. PCR: Primer left

<400> 8
ttatatggta ccatgaacat acgagggtca cct 33

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> 2. PCR: Primer right

<400> 9
ttatatgagc tcttactcgg ccgtcggaga tgg 33